SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

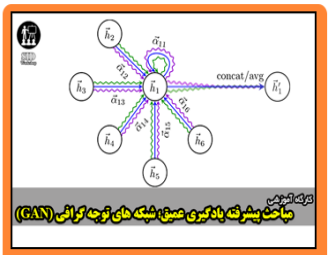
سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین مکالمه روزمره انگلیسی

کارگاه آنلاین آموزش استفاده از وب آو ساینس



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی

(Graph Attention Networks)

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

ابداع يک روش RT-PCR-RFLP براي تمايز ويروس هاي فوق حاد بيماري بورس عفوني فيلد ايران با سويه های گزارش شده در دنيا

مهدي شمس آراء* [۱و۲]، علي قريشي [۱]، غلامرضا احمديان [۱]، ريحانه صالحي تبار [۱]**
۱- پژوهشگاه ملي مهندسي ژنتيك و زيست فناوري، صندوق پستي ۱۴۱۵۵-۶۳۴۳، تهران، ايران
۲- گروه ژنتيك، دانشكده علوم پايه، دانشگاه تربيت مدرس، صندوق پستي ۱۴۱۱۵-۱۷۵، تهران، ايران

چكيده
ويروس بيماری بورس عفوني (IBDV) تبديل به يكي از مسائل عمده صنعت مرغداری در سالهای اخير شده است. ژن VP2 از طيور مبتلا به بيماري بورس عفوني (IBD) بوسيله reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) تكثير شد. با مقايسه ترادف نوكلئوتيدي VP2 با ساير ويروس هاي گزارش شده در دنيا برخي اختلافات مشخص شد. در اين بين يك جايگاه برش آنزيم *Sma* I در قسمت ثابت ژن VP2 ويروس مشاهده گرديد. ساير نمونه هاي آلوده به ويروس مورد آزمايش RT-PCR قرار گرفت. محصول PCR با آنزيم *Sma* I هضم و نتايج با الكتروفورز ژل آگاروز بررسي شد. جايگاه برش آنزيم *Sma* I بر روي ويروس هاي مورد مطالعه وجود داشت. از اين روش می توان برای شناسايي ويروس حاد گامبوروی ايران استفاده كرد.
كلمات كليدي: ويروس بيماري بورس عفوني، ژن VP2، RT-PCR-RFLP

Development of a RT-PCR-RFLP Assay for Differentiation Between Iranian Very Virulent Infectious Bursal Disease Viruses and Reported Strains in the World

Mehdi Shamsara* [1,2], Ali Ghorashi[1], Gholamreza Ahmadian [1], Reyhaneh Salehi-Tabar [1]**
1- National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, P. O. Box: 14155-6343, Tehran, IRAN
2- Dept of Genetics, Faculty of Sciences, Tarbiate Modarres University, P. O. Box: 14115-175, Tehran, IRAN

Abstract

Infectious bursal disease virus (IBDV) has become a major problem of poultry fields in recent years. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for amplification of VP2 gene of very virulent (vv) IBDV from infected chickens. Some nucleotide differences were appeared between the VP2 gene of the virus and other reported strains around the world. A new *Sma* I restriction site was revealed in conserved region of the gene. Infected samples with IBDV were tested by RT-PCR-RFLP. The same pattern was showed among the studied viruses. This test can be used for diagnosis of the Iranian vvIBDV.
Key words: infectious bursal disease virus, VP2 gene, RT-PCR-RFLP

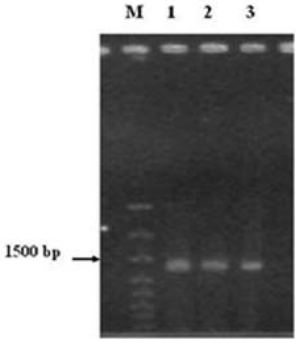
مقدمه
IBDV از خانواده Birnaviridae عامل ايجاد كننده يک بيماري بسيار واگيردار در جوجه هاي جوان به نام بيماري بورس عفوني يا گامبورو مي باشد. اين ويروس با تخريب سلول هاي B در بورس فابريسيوس و ايجاد نقص ايمني شديد، باعث حساس شدن جوجه ها نسبت به پاتوژن ها و نيز پاسخ غيرموثر آنها به واكسن ها مي شود (Chevalier et al., 2002; Martinez-Torrecuadrada et al., 2003). ژنوم IBDV از دوقطعه RNA دو رشته اي تشكيل شده است. پروتيين VP2 ايمونوژن اصلي محافظت كننده ميزبان در برابر ويروس مي باشد. ناحيه مياني VP2، شامل اسيد آمينه هاي ۲۰۶ تا ۳۵۰، متغيير است و داراي اپي‌توپ‌هاي كنفورماسيوني است كه باعث القاء آنتي‌بادي‌هاي خنثي‌كننده ويروس مي شوند (Chang et al., 2002; Bayliss et al., 1990). در مطالعه اخير روشي بر مبناي RT-PCR-RFLP پيشنهاد شده است كه بوسيله آن مي توان ويروس فيلد ايران را از ساير ويروس های IBDV متمايز كرد.

مواد و روشها
نمونه گيري و استخراج RNA **تام.** نمونه هاي بافتي آلوده به گامبورو از مناطق بيرجند، آمل و اراك جمع آوري شدند. ۱۰۰ - ۵۰ ميلي گرم از نمونه بافت در هاون چيني هموژن شد و RNA تام به روش RNA fast (پژوهشگاه ملي مهندسي ژنتيك و زيست فناوري) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد.
RT-PCR. پرايمرهاي ژن VP2 از روي توالي هاي موجود در بانک ژن طراحي شد. اختصاصي بودن پرايمرهاي با Blastn و ساختار ثانويه و ديمر شدن با نرم افزار Oligo6 بررسي شد. ژن VP2 بوسيله RT-PCR تكثير شد و محصول PCR براي توالي يابي ارسال شد.
مقايسه توالي نوكلئوتيدي و نقشه هضم آنزيمي ژن VP2. با استفاده از نرم افزار DNAStar و روش Clustal توالي نوكلئوتيدي ژن VP2 ويروس با ساير ويروس هاي گزارش شده در دنيا همرديف شد. سپس نقشه هضم آنزيمي ژن VP2 بررسي شد.
هضم آنزيمي با *Sma* I.. محصول PCR ويروس هاي مناطق بيرجند، آمل و اراك بوسيله آنزيم *SmaI* هضم شدند. نتيجه هضم آنزيمي روي ژل آگاروز ۱% الكتروفورز گرديد.

نتايج
ژن VP2 بطول كامل تكثير شد و محصول PCR به طول تقريبي bp ۱۴۰۰ روي ژل آگاروز ۱% الكتروفورز شد (شكل ۱). همرديفي توالي نوكلئوتيدي ژن VP2 ويروس بيرجند با ساير ويروس هاي گامبورو گزارش شده در دنيا اختلافاتي را نشان داد. با ترسيم نقشه هضم آنزيمي مشاهده شد كه در اثر ترانسورژن T→G در نوكلئوتيد ۱۹۲ يك محل برش آنزيم *Sma* I در ويروس جدا شده از ايران ايجاد شده است. بررسي توالي نوكلئوتيدي در ساير سويه هاي گزارش شده در دنيا نشان داد كه چنين جايگاه برشي در آنها وجود ندارد (شكل ۲). بر اين اساس نمونه هايي از بورس هاي آلوده به IBDV از آمل و اراك جمع آوري شد و ژن VP2 آنها تكثير شد. پس از هضم با آنزيم *Sma* Iنتيجه با الكتروفورز ژل آگاروز بررسي شد. محصول PCR ويروس هاي ايران بوسيله آنزيم *Sma* I برش خورده بود(شكل ۳).

بحث

بيماري گامبورو يك بيماري واگيردار است كه صدمات اقتصادي جبران ناپذيري به صنعت مرغداري وارد مي كند. امروزه با بكارگيري تكنيك هاي مولكولي نظير PCR-RFLP، ARMS-PCR و يا روشهاي دورگه سازي مي توان نشانگرهاي مولكولي را در سطح ژنوم ويروس رديابي كرد و منشاء بيماري را بدرستي تشخيص داد. هضم آنزيمي محصولات PCR ناحيه متغيير ژن VP2 ويروس IBD براي تاييد صحت محصولات PCR و تمايز سويه هاي IBDV استفاده شده است (Jackwood and Jackwood, 1997). در مطالعه اخير طول كامل ژن VP2 ويروس هاي ايران براي يافتن نشانگرهاي مولكولي جديد مورد بررسي قرار گرفت. نتيجه اين بررسي ها اين بود كه در ناحيه ابتدايي و ثابت ژن VP2 ويروس هاي ايران جايگاه برش آنزيم *Sma* I وجود دارد. در صورتيكه چنين جايگاه آنزيمي در ساير ويروس هاي گزارش در دنيا شناخته نشده است. البته با توجه به اينكه به سويه هاي خارجي ويروس دسترسي نبود، مقايسه با اين سويه هاي تنها با بررسي توالي هاي نوكلئوتيدي موجود در بانك ژن انجام شد. اين روش در مطالعات همه گير شناسي براي تشخيص منشا ويروس و نحوه انتشار آن كاربرد دارد. همچنين در برنامه هاي كنترلي چنانچه ويروسي متفاوت با ويروس های جدا شده در ايران از خارج كشور توسط محصولات دامي، مرغ زنده يا پرندگان وحشي وارد كشور شود با اين روش قابل شناسايي است. از مزيت هاي اين تكنيك مي توان به سرعت بالا، سادگي و قابل اعتماد بودن آن اشاره كرد.



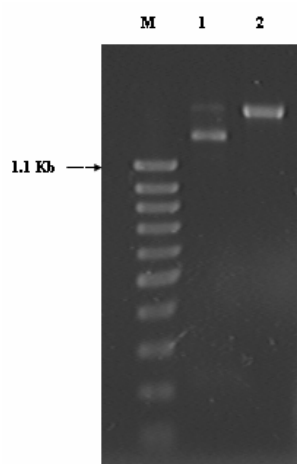
شكل ۱: تكثير ژن VP2 بوسيله RT-PCR
رديف M
رديف هاي ۱، ۲ و ۳ ژن VP2 تكثير شده

ماركر وزن مولكولي

```
                    190  *        200                 210
IRAN        C C T G G C T T C C C G G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
CEF94       C C T G G A T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
CJ801bkf    C C T G G A T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
Cu-1        C C T G G A T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
GZ29112     C C T G G A T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
Harbin-1    C C T G G T T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
HK46        C C T G G T T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
HKL6        C C T G G A T T C C C T G G C T C A A C T G T G G G T G C T 210
K310        C C T G G A T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
OH          C C T G G A T T C C C T G G T T C A G T T G T A G G T G C T 210
OKYM        C C T G G T T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
P2          C C T G G A T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
SH9         C C T G G T T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
UK661       C C T G G C T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
VariantE    C C T G G A T T C C C T G G C T C A A T T G T G G G T G C T 210
```

شكل ۲: ترانسورژن T→G نوكلئوتيد ۱۹۲ در ويروس ايراني (*)

موجب ايجاد جايگاه *Sma* I شده است.



شکل ۳: هضم آنزيمي محصول PCR ژن VP2 ويروس جدا شده در ايران با *Sma* I
رديف M ماركر وزن مولكولي
رديف ۱ محصول PCR ژن VP2 هضم شده با *Sma* I
بطول ۱۲۰۰bp (قطعه ۲۰۰bp مشاهده نمي شود)
رديف ۲ محصول PCR ژن VP2 بطول ۱۴۰۰bp

منابع

Bayliss C.D., Spies U., Shaw K., Peters R.W., Papageorgiou A., Muller H., and Boursnell M.E., A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. J. Gen. Virol. 1990: 171, 1303-1312.

Chang H.C., Lin T.L., and Wu C.C., DNA mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens. Vaccine 2002: 20, 328-35.

Chevalier C., Lepault J., Erk I., Da Costa B., and Delmas B.. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. J. Virol. 2002: 76, 2384-2392.

Jackwood D.J., and Jackwood R.J., Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. Avian Dis. 1997: 97-104

Martinez-Torrecuadrada J.L., Saubi N., Pages-Mante A., Caston J.R., Espuna E., and Casal J.I., Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines. Vaccine 2003: 21, 3342-3350.

SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

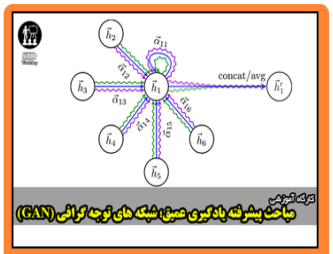
سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین مکالمه روزمره انگلیسی

کارگاه آنلاین آموزش استفاده از وب آو ساینس



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی

(Graph Attention Networks)